

DOI: 10.17516/1998-2836-0203

УДК 543.545, 54.04

Determining Stability Constants of Complexes Between Ester Betulin Derivatives and β -Cyclodextrin by Affinity Capillary Electrophoresis

Viktoria V. Sursyakova^{*a},Vladimir A. Levdansky^a and Anatoly I. Rubaylo^{a,b}^a*Institute of Chemistry and Chemical Technology SB RAS
FRC “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”**Krasnoyarsk, Russian Federation*^b*Siberian Federal University**Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 02.10.2020, received in revised form 05.11.2020, accepted 03.12.2020

Abstract. Inclusion complexes of ester betulin derivatives (pentacyclic lupane triterpenoids) with β -cyclodextrin (β -CD) were studied by affinity capillary electrophoresis. Stability constants were calculated from dependencies of viscosity-corrected effective electrophoretic mobilities on β -CD concentration (0–10 mM) in background electrolytes using nonlinear regression fitting. Logarithms of stability constants at 25 °C for 1:1 and 1:2 β -CD complexes of betulin 3,28-diphthalate, betulin 3,28-disuccinate and betulin 3,28-disulfate (95 % confidence interval) are 4.25 (4.16–4.32) and 7.27 (6.73–7.50), 4.38 (4.26–4.48) and 7.58 (6.90–7.84), 4.04 (4.00–4.08) and 5.91 (4.60–6.20), respectively.

Keywords: drug delivery, host-guest complexes, capillary electrophoresis, binding constants, inclusion complexes.

Citation: Sursyakova V.V., Levdansky V.A., Rubaylo A.I. Determining stability constants of complexes between ester betulin derivatives and β -cyclodextrin by affinity capillary electrophoresis, J. Sib. Fed. Univ. Chem., 2020, 13(4), 534–541. DOI: 10.17516/1998-2836-0203

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: viktorija_vs@list.ru

Определение констант устойчивости комплексов эфирных производных бетулина с β -циклодекстрином методом аффинного капиллярного электрофореза

В.В. Сурсякова^а, В.А. Левданский^а, А.И. Рубайло^{а,б}

^аИнститут химии и химической технологии СО РАН
ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»

Российская Федерация, Красноярск

^бСибирский федеральный университет
Российская Федерация, Красноярск

Аннотация. Исследованы комплексы включения, образованные эфирными производными бетулина (пентациклическими тритерпеноидами лупанового ряда) и β -циклодекстрином (β -ЦД), с применением аффинного капиллярного электрофореза. Методом нелинейной регрессии из полученных зависимостей электрофоретических подвижностей от концентрации β -ЦД (0-10 мМ) в фоновых электролитах найдены константы устойчивости. Значения логарифмов констант устойчивости для 1:1 и 1:2 β -ЦД комплексов при 25 °С для 3,28-дифталата, 3,28-дисукцината и 3,28-дисульфата бетулина (95 % доверительный интервал) составили 4.25 (4.16-4.32) и 7.27 (6.73-7.50), 4.38 (4.26-4.48) и 7.58 (6.90-7.84), 4.04 (4.00-4.08) и 5.91 (4.60-6.20) соответственно.

Ключевые слова: доставка лекарств, комплексы хозяин-гость, капиллярный электрофорез, константы связывания, комплексы включения.

Цитирование: Сурсякова, В.В. Определение констант устойчивости комплексов эфирных производных бетулина с β -циклодекстрином методом аффинного капиллярного электрофореза / В.В. Сурсякова, В.А. Левданский, А.И. Рубайло // Журн. Сиб. федер. ун-та. Химия, 2020. 13(4). С. 534–541. DOI: 10.17516/1998-2836-0203

Введение

Бетулин и его производные, пентациклические тритерпеноиды лупанового ряда, обладают рядом полезных свойств (противовирусная, противораковая и другая активность) и широко распространены в природе [1]. Однако их молекулы достаточно гидрофобны, вследствие чего бетулин и некоторые его производные плохо растворимы в воде. Для повышения растворимости и биодоступности часто используют комплексы включения (комплексы хозяин-гость, супрамолекулярные комплексы) таких гидрофобных веществ с циклодекстринами. Циклодекстрины (ЦД) [2] – природные циклические олигосахариды, построенные из остатков α -1,4-связанных D-глюкопираноз. Наиболее распространенными являются молекулы ЦД с 6, 7 и 8 остатками глюкозы, которые называются α -, β - и γ -ЦД соответственно. Они характеризуются уникальной структурой: молекула имеет форму усеченного конуса, внутренняя полость которого гидрофобна, благодаря наличию этой полости ЦД способны образовывать с различными

соединениями комплексы включения. В этих комплексах ЦД выступает как молекула хозяина, а различные соединения являются гостевыми молекулами.

Одним из современных методов с небольшим расходом реагентов для изучения ЦД комплексов считается метод аффинного капиллярного электрофореза (АКЭ). Наиболее распространенный его вариант основан на измерении электрофоретической подвижности гостевых молекул (аналита) в фоновых электролитах с различным содержанием ЦД. На основе следующего ниже уравнения методом нелинейной регрессии определяют константы устойчивости:

$$v \cdot \mu_{эфф} = \frac{\mu_0 + \mu_{11} \beta_{11} [ЦД]_i + \mu_{12} \beta_{12} [ЦД]_i^2}{1 + \beta_{11} [ЦД]_i + \beta_{12} [ЦД]_i^2}, \quad (1)$$

где v – коэффициент для коррекции изменения вязкости фонового электролита; $\mu_{эфф}$ – эффективная электрофоретическая подвижность; μ_0 , μ_{11} и μ_{12} – ионные подвижности исследуемого соединения, 1:1 и 1:2 комплекса соответственно; β_{11} и β_{12} – константы устойчивости 1:1 и 1:2 комплекса; $[ЦД]$ – концентрация ЦД в фоновом электролите.

Ранее были изучены комплексы ряда производных бетулина (бетулиновая и бетулоновая кислоты, 3,28-дифталат и 3,28-дисукцинат бетулина, сульфатированные производные бетулина) с β -ЦД, гидроксипропил- β - и γ -ЦД (ГП- β -ЦД и ГП- γ -ЦД) [3-10]. Для исследования этих комплексов с практически нерастворимыми соединениями был предложен новый метод, основанный на комбинации метода растворимости и капиллярного зонного электрофореза [5]. Также в процессе исследования ГП- γ -ЦД комплексов были рассмотрены особенности применения АКЭ для определения достаточно больших значений констант устойчивости циклодекстриновых комплексов с $\log \beta_{11} \sim 7$; обычно логарифмы констант устойчивости для ЦД комплексов находятся в диапазоне 1-4 [8, 9]. Показано, что для ГП- β -ЦД характерно наличие 1:1 и 1:2 комплексов с производными бетулина [6] в отличие от ГП- γ -ЦД, для которого характерны только 1:1 комплексы [8, 9].

Цель данной работы – исследование β -ЦД комплексов эфирных производных бетулина методом АКЭ. Комплексы 3,28-дифталата (ДФБ) и 3,28-дисукцината бетулина (ДСКБ) с β -ЦД впервые изучены в рамках данной работы, в то время как β -ЦД комплексы 3,28-дисульфата бетулина (ДСБ) уже ранее исследовались, но в ограниченном концентрационном диапазоне β -ЦД, и была определена константа устойчивости только для 1:1 комплекса [3].

Материалы и методы

В работе использовали реактивы марки ч.д.а. или х.ч. Растворы готовили из деионизованной воды (система очистки воды Direct Q3, Millipore, France) и фильтровали через 0.45 мкм фильтры. β -ЦД (> 98 %) был приобретен в Acros Organics (Belgium). Раствор 10 мМ тетрабората натрия с pH 9.18 с добавками 0-10 мМ β -ЦД был применен как фоновый электролит, β -ЦД растворяли непосредственно в растворе тетрабората натрия. В качестве маркера электроосмотического потока (ЭОП) использовали 0.001 % диметилсульфоксид (ДМСО). Производные бетулинов синтезированы как описано в работах [11-13]. Растворы производных бетулина с концентрацией 1 г/л готовили путем растворения точных навесок в 10 мМ тетраборате натрия. Образцы аналитов для ввода в капилляр готовили путем разбавления концентрированных растворов соответствующим фоновым электролитом.

В работе использовали прибор Красноярского регионального центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН – систему капиллярного электрофореза с диодно-матричным детектором Agilent 7100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Применяли немодифицированный кварцевый капилляр с внутренним диаметром 50 мкм, общей и эффективной длиной 80.5/72 см. Капилляр термостатировали при 25 ± 0.04 °C. Детектирование проводили в УФ-области при 200 нм. Разделение осуществляли при +30 кВ. Образцы вводили в капилляр гидродинамически при давлении 50 мбар в течение 5 с. Все эксперименты проводили в 3-5 параллелях. В начале каждого дня капилляр промывали 0.1 М NaOH в течение 10 мин, дважды водой по 5 мин, затем фоновым электролитом в течение 10 мин. Между съемками капилляр промывали фоновым электролитом в течение 3 мин.

Эффективная электрофоретическая подвижность из экспериментальных данных рассчитывалась следующим образом:

$$\mu_{эфф,i} = \frac{l \cdot l_{эфф}}{U} \left(\frac{1}{a_{1,i} - t_{кор}} - \frac{1}{t_{ЭОП} - t_{кор}} \right), \quad (2)$$

$$t_{кор} = (t_{окон} + t_{нач})/2, \quad (3)$$

где l и $l_{эфф}$ – общая и эффективная длина капилляра; U – напряжение; $a_{1,i}$ – центр пика функции Хаархова-Ван-дер Линде (ХВЛ, Haarhoff-Van der Linde function) для i пика [14]; $t_{кор}$ – коррекционная поправка времени, учитывающая то, что напряжение прикладывается не моментально и не с нулевого момента времени; $t_{ЭОП}$ – время миграции маркера ЭОП (нейтрального соединения – ДМСО); $t_{нач}$ – время, с которого начинает прикладываться напряжение (0.01 мин); $t_{окон}$ – время, при котором напряжение достигает заданного значения (0.18 мин).

Коэффициент для коррекции изменения вязкости фонового электролита рассчитывали следующим образом [9, 10]:

$$v = t' / t^0, \quad (4)$$

где t' и t^0 – времена ДМСО пика, полученные при напряжении 0 кВ и давлении 100 мбар в фоновых электролитах с добавкой β-ЦД и без нее соответственно.

Константы устойчивости комплексов и ионные подвижности рассчитывали путем нелинейной регрессии с использованием MS Excel и OriginPro 8.1 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) [8]. Параметр a_l ХВЛ функции для электрофоретических пиков находили с применением программ MS Excel и CEval (Prague, Czech Republic [15]).

Результаты и их обсуждение

Были зарегистрированы электрофореграммы производных бетулина с использованием фоновых электролитов с концентрацией β-ЦД от 0 до 10 мМ. Брали минимально возможную концентрацию аналитов – такую, чтобы отношение сигнал/шум пиков равнялось 10. Для исследованных соединений это 0.002, 0.02 и 0.07 мМ для ДФБ, ДСБ и ДСкБ соответственно. На рис. 1а приведен пример электрофореграмм.

По уравнениям (2)-(4) были рассчитаны эффективные электрофоретические подвижности. При наличии β-ЦД в фоновом электролите пики были треугольными и для них при расчете

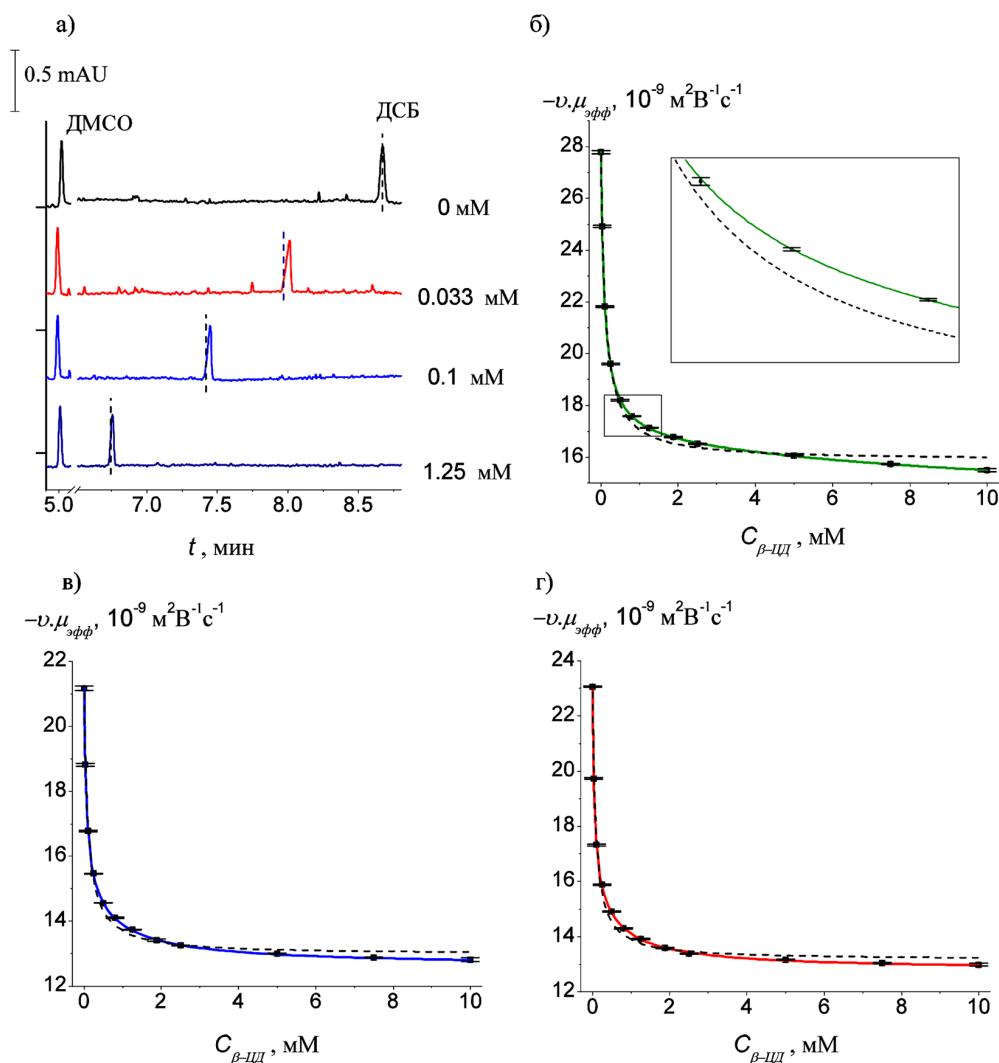


Рис. 1. Примеры электрофореграмм ДСБ, полученные при разном содержании β-ЦД в фоновом электролите (а), и зависимости эффективной электрофоретической подвижности, скорректированной на изменение вязкости, от концентрации β-ЦД в фоновом электролите (б, в). Аналиты (концентрация): б – ДСБ (0.02 мМ); в – ДФБ (0.002 мМ); г – ДСкБ (0.07 мМ). В блоке а) вертикальной пунктирной линией показано время, соответствующее a_l параметру ХВЛ функции. В блоках б)-г) точки соответствуют экспериментальным значениям, сплошные линии – теоретическим зависимостям, учитывающим 1:1 и 1:2 комплексообразование, пунктирные линии – теоретическим зависимостям, учитывающим только 1:1 комплексообразование. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение соответствующих величин. В прямоугольнике показаны точки, планки погрешностей и теоретические зависимости в увеличенном масштабе

Fig. 1. Examples of electropherograms of betulin 3,28-disulfate obtained using background electrolytes with different β-CD content (a) and dependencies of viscosity-corrected effective electrophoretic mobilities on β-CD concentration in background electrolytes (б-г). Analyte (concentration): б) betulin 3,28-disulfate (0.02 mM), в) betulin 3,28-diphthalate (0.002 mM), г) betulin 3,28-disuccinate (0.07 mM). In section a), the vertical dashed lines show the time corresponding to the a_l parameter of the Haerhoff-Van der Linde function. In sections б)-г), the points are experimental values, the solid lines correspond to the theoretical curves taking into account 1:1 and 1:2 complexation, and the dashed lines correspond to the theoretical curves taking into account only 1:1 complexation. The error bars represent standard deviations of corresponding values. In a rectangle on б), the points, error bars and theoretical curves are shown on a larger scale

подвижности использовали a_I параметр ХВЛ функции, как описано в работах [8, 9]. На рис. 1а время, отвечающее a_I параметру, обозначено пунктирной линией. Видно, что для треугольных пиков отличие может быть довольно значительным. Также в работе [9] показано, что значения констант устойчивости могут быть занижены на 50-70 %, если использовать вместо a_I параметра время, отвечающее максимуму пика.

На рис. 1б-г видно, что полученные экспериментальные точки не описываются теоретическими кривыми, учитывающими только 1:1 взаимодействие (пунктирные линии). На основе рассчитанных подвижностей методом нелинейной регрессии рассчитаны значения констант устойчивости для 1:1 и 1:2 комплексов. Как можно видеть на рис. 1б-г, теоретические кривые, учитывающие образование 1:1 и 1:2 комплексов, хорошо согласуются с экспериментальными точками. Рассчитанные значения констант устойчивости и ионных подвижностей приведены в табл. 1. Как видим по данным табл. 1, ДФБ и ДСкБ имеют близкие с учетом погрешности значения констант устойчивости, в то время как константы устойчивости для ДСБ несколько ниже. Как и в случае комплексов этих соединений с ГП-γ-ЦД [9], это можно объяснить небольшим сродством фталатных и сукцинатных групп к внутренней гидрофобной полости ЦД. Кроме того, полученное значение константы устойчивости для ДСБ отличается от значения, полученного ранее, но в предыдущем исследовании использовался достаточно узкий диапазон концентраций β-ЦД (до 2 мМ по сравнению с 10 мМ, см. рис. 1б) и линеаризационный способ «двойных обратных величин», который, как было показано в [10], не позволяет выявить наличие 1:2 комплексов.

Таблица 1. Значения констант устойчивости для 1:1 и 1:2 комплексов исследованных соединений с β-ЦД и ионные подвижности соответствующих анионов при 25 °С. В скобках или после «±» указан 95 % доверительный интервал

Table 1. Stability constants for 1:1 and 1:2 complexes of the compounds under study with β-CD and ionic mobilities of corresponding species. In brackets or after «±», the 95 % confidence interval is shown

Аналит ^а	Log β_{11}	Log β_{12}	Ионные подвижности ($10^{-9} \text{ м}^2 \text{ В}^{-1} \text{ с}^{-1}$)			Ссылка
			$-\mu_0$	$-\mu_{11}$	$-\mu_{12}$	
ДСБ	4.04 (4.00-4.08)	5.91 (4.60-6.20)	27.8 ± 0.1	16.7 ± 0.2	13.7 ± 1.9	Данная работа
	3.87 ± 0.01 ^б	- ^в	- ^г	- ^г	- ^г	[3]
ДФБ	4.25 (4.16-4.32)	7.27 (6.73-7.50)	21.2 ± 0.1	14.8 ± 0.7	12.6 ± 0.1	Данная работа
ДСкБ	4.38 (4.26-4.48)	7.58 (6.90-7.84)	23.1 ± 0.1	15.8 ± 1.0	12.8 ± 0.1	
АСБ	4.00 ± 0.02 ^б	- ^в	- ^г	- ^г	- ^г	[3]

^аДСБ – 3,28-дисульфат бетулина, ДФБ – 3,28-дифталат бетулина, ДСкБ – 3,28-дисукцинат бетулина, АСБ – 3-ацетат-28-сульфат бетулина.

^б Для расчета доверительного интервала использован другой, отличный от используемого в данной статье, подход.

^в Из-за узкого используемого диапазона β-ЦД концентраций в фоновом электролите и применения линеаризационного способа «двойных обратных величин» константы устойчивости для 1:2 комплексов не были определены.

^г В тексте статьи [3] ионные подвижности не упомянуты.

Заключение

Таким образом, методом аффинного капиллярного электрофореза исследовано комплексообразование 3,28-дифталата, 3,28-дисукцината и 3,28-дисульфата бетулина с β -ЦД. Установлено, что полученные зависимости подвижностей описываются с учетом образования комплексов с 1:1 и 1:2 стехиометрией. Рассчитаны значения констант устойчивости этих комплексов.

Благодарности / Acknowledgements

Работа выполнена в рамках государственного задания Института химии и химической технологии СО РАН (проект АААА-А17-117021310221-7) с использованием оборудования Красноярского регионального центра коллективного пользования ФИЦ КИЦ СО РАН.

This work was conducted within the framework of the budget project АААА-А17-117021310221-7 for Institute of Chemistry and Chemical Technology SB RAS using the equipment of Krasnoyarsk Regional Research Equipment Centre of SB RAS.

Список литературы / References

1. Tolstikova T.G., Sorokina I.V., Tolstikov G.A., Tolstikov A.G., Flekhter O.B. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I. Natural lupane derivatives. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 2006. Vol. 32 (1), P. 37–49.
2. Crini G. Review: A history of cyclodextrins. *Chemical Review* 2014. Vol. 114, P. 10940–10975.
3. Popova O.V., Sursyakova V.V., Burmakina G.V., Levdansky V.A., Rubaylo A.I. Determination of stability constants of inclusion complexes of betulin derivatives with β -cyclodextrin by capillary electrophoresis. *Doklady Chemistry* 2015. Vol. 461(1), P. 67–69.
4. Попова О.В., Сурсякова В.В., Бурмакина Г.В., Максимов Н.Г., Левданский В.А., Рубайло А.И. Исследование растворимости бетулоновой кислоты в присутствии гидроксипропил- γ -циклодекстрина методом капиллярного электрофореза. *Журнал Сибирского федерального университета. Химия* 2016. Т. 9(2), С. 171–176. [Popova O.V., Sursyakova V.V., Burmakina G.V., Maksimov N.G., Levdansky V.A., Rubaylo A.I. Solubility study of betulonic acid in the presence of hydroxypropyl- γ -cyclodextrin by capillary electrophoresis. *Journal of Siberian Federal University. Chemistry* 2016. Vol. 9(2), P. 171–176. (In Russ.)].
5. Sursyakova V.V., Maksimov N.G., Levdansky V.A., Rubaylo A.I. Combination of phase-solubility method and capillary zone electrophoresis to determine binding constants of cyclodextrins with practically water-insoluble compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2018. Vol. 160, P. 12–18.
6. Sursyakova V.V., Levdansky V.A., Rubaylo A.I. Thermodynamic parameters for the complexation of water-soluble betulin derivatives with (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin determined by affinity capillary electrophoresis. *Journal of Molecular Liquids* 2019. Vol. 283, P. 325–331.
7. Sursyakova V.V., Levdansky V.A., Rubaylo A.I. Thermodynamic parameters for the complexation of water-insoluble betulin derivatives with (2-hydroxypropyl)- γ -cyclodextrin determined by phase-solubility technique combined with capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 2019. Vol. 40(12–13), P. 1656–1661.

8. Sursyakova V.V., Levдansky V.A., Rubaylo A.I. Strong complexation of water-soluble betulin derivatives with (2-hydroxypropyl)- γ -cyclodextrin studied by affinity capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2020. Vol. 41(1-2), P. 112-115.
9. Sursyakova V.V., Levдansky V.A., Rubaylo A.I. Determination of binding constants for strong complexation by affinity capillary electrophoresis: the example of complexes of ester betulin derivatives with (2-hydroxypropyl)- γ -cyclodextrin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2020. Vol. 412(23), P. 5615-5625.
10. Sursyakova V.V., Levдansky V.A., Rubaylo A.I. Determining binding constants for 1:1 and 1:2 inclusion complexes of ester betulin derivatives with (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin by affinity capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. DOI: 10.1002/elps.202000189.
11. Levдanskii V.A., Levдanskii A.V., Kuznetsov B.N. Synthesis of betulin dibenzoate and diphthalate. *Chemistry of Natural Compounds* 2017. Vol. 53(2), P. 310–311.
12. Патент 2614149 РФ. Левданский В.А., Левданский А.В., Кузнецов Б.Н. Способ получения дифталата бетулинола. Оpubл. 23.03.2017. [Patent 2614149 RU. Levдanskij V.A., Levдanskij A.V., Kuznetsov B.N. Method for producing betulinol diphtalate. Publ. Date 23.03.2017 (In Russ.)].
13. Патент 2638160 РФ. Левданский В.А., Левданский А.В., Кузнецов Б.Н. Способ получения дисукцината бетулинола. Оpubл. 12.12.2017 [Patent 2638160 RU. Levдanskij V.A., Levдanskij A.V., Kuznetsov B.N. Method of producing betulinol disuccinate. Publ. Date 12.12.2017 (In Russ.)].
14. Le Saux T., Varenne A., Gareil P. Peak shape modeling by Haarhoff-Van der Linde function for the determination of correct migration times: A new insight into affinity capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2005. Vol. 26, P. 3094–3104.
15. Dubský P., Ördögová M., Malý M., Riesová M. CEval: All-in-one software for data processing and statistical evaluations in affinity capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 2016. Vol. 1445, P. 158–165.